

# METHOD FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCE AND REAGENT KIT THEREFOR

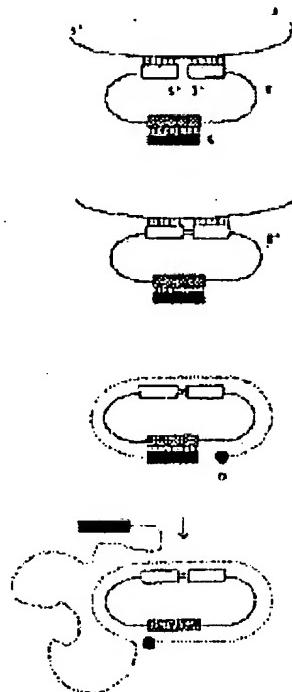
**Publication number:** JP4262799  
**Publication date:** 1992-09-18  
**Inventor:** AONO TOSHIYA; TAKARADA YUTAKA  
**Applicant:** TOYO BOSEKI  
**Classification:**  
- international: A61B10/00; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; A61B10/00; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): A61B10/00; C12N15/10; C12Q1/68.  
- European:  
**Application number:** JP19910046193 19910218  
**Priority number(s):** JP19910046193 19910218

[Report a data error here](#)

## Abstract of JP4262799

**PURPOSE:** To efficiently amplify a single-stranded nucleic acid by treating a specimen with a straight-chain probe nucleotide having a sequence circularizable with the target nucleic acid in the specimen, and by using the product as the template, producing a single-stranded nucleic acid complementary to the template using a primer nucleotide.

**CONSTITUTION:** A target nucleic acid sequence A is hybridized with a straight-chain probe nucleotide B designed so as to circularize as a result of existence of a target nucleic acid sequence A using a primer nucleotide C having sequence which is at least partially complementary to the straight-chain probe nucleotide B to circularize the straight-chain probe nucleotide B. By using the resultant circular probe nucleotide B' as a template and utilizing the primer nucleotide C, a single stranded nucleic acid sequence is amplified by amplifying a repeated sequence complementary to the template.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-262799

(43)公開日 平成4年(1992)9月18日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/68	Z 8114-4B			
C 12 N 15/10				
C 12 Q 1/68	ZNA A 8114-4B			
// A 61 B 10/00	T 7831-4C			
	8828-4B		C 12 N 15/00	A
		審査請求 未請求 請求項の数5(全9頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平3-46193

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

(22)出願日 平成3年(1991)2月18日

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 青野 利哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

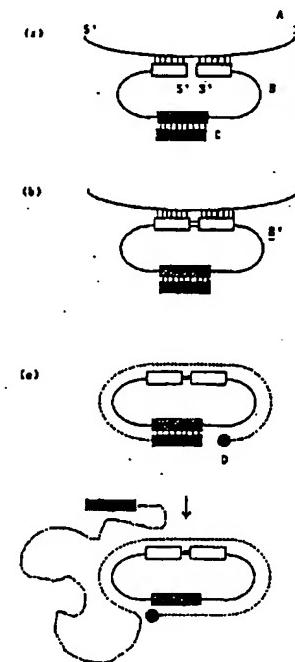
(54)【発明の名称】 核酸配列の增幅方法およびそのための試薬キット

(57)【要約】

【目的】 標的とする核酸を簡便に増幅させる。

【構成】 検体試料中の標的核酸配列(A)に、該標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、該直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化した環状プローブヌクレオチド(B')を錐型とし、上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を利用して、錐型と相補的な配列の繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより、核酸配列を増幅させる。

【効果】 非特異反応が抑制され、特定の配列のみを増幅することが可能である。また、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼを用いることにより、環状化したプローブヌクレオチド1分子から複数の核酸配列が生成されるので、効率よく増幅することが可能である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくともこの直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、標的核酸配列(A)に直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を錠型として、プライマースクレオチド(C)を利用し、錠型と相補的な配列の繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより、核酸配列を増幅させることを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項2】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：プライマースクレオチド(C)を操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状スクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状スクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ボリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項3】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)とプライマースクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：検体試料中の標的核酸(A)を、操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を

連結させて、環状スクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状スクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ボリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項4】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(d)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)、標的核酸配列(A)およびプライマースクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状スクレオチド(B')とする。

操作(c)：操作(b)で生成した環状スクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ボリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(d)：必要により、操作(c)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(c)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項5】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の隣接した直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状スクレオチド(B')とする。

操作(c)：プライマースクレオチド(C)を操作(b)で生成した環状プローブヌクレオチド(B')とアニールさせる。

操作(d)：操作(c)で生成した環状スクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ボリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回

繰り返す。

【請求項6】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)、該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)、連結手段、核酸ポリメラーゼおよびスクレオチド三リン酸を含む核酸増幅用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は核酸の増幅方法およびそのための試薬キットに関する。この発明は特に、塩基配列が既知の核酸を、その初期に存在する量に比較して、より大量に生成させる方法に関する。本発明を実施することにより、遺伝病、癌、感染症などの診断を行うことが容易となる。

【0002】

【従来技術】 近年、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出は遺伝病、癌、感染症などの診断のために有効な手段として汎用されるようになってきた。核酸検出法において、標的とする塩基配列は、対象となる核酸のほんの僅かな部分である場合があり、非放射性標識プローブや末端を放射性同位体で標識したオリゴスクレオチドプローブを用いた検出法では、感度上の問題等によりその検出が困難である。そのため、プローブ検出システムの感度を向上させるための努力が多くなされている(W087/03622など)。また、感度向上の手段として、標的とする核酸をDNAポリメラーゼにより増幅させる方法(特開昭61-274697号公報;以下「PCR」と略すことがある)が開示されている。しかし、この方法では複雑な温度の調節が必要であり、専用の機器を必要とするという欠点がある。DNAリガーゼを用いる増幅法も開示されている(W089/12696、特開平2-2934号公報など)。しかし、これらの方法ではDNAリガーゼが平滑末端を連結する反応(blunt end ligation)により非特異的増幅が起こる。この問題の回避法として、W089/12696では3組以上のプローブを用いているが、プローブ数が多くコスト高となってしまう欠点がある。また、RNAポリメラーゼを用いてDNAよりRNAが生成されることは周知であり、RNAポリメラーゼを用いて核酸の増幅を行う方法も開示されている(W089/01050)。しかしながら、この方法ではRNAポリメラーゼによる転写増幅のみでは充分な増幅は困難である。従って、生成したRNAに再度逆転写酵素を作用させDNAを生成させる操作を実施している。一方、標的とする核酸にプローブをハイブリダイズさせた後、正しくハイブリダイズしたプローブのみを増幅する方法(BIO/TECHNOLOGY vol.6, 1197, 1988)も知られている。しかしこの方法では、非特異反応により結合したプローブも増幅され、プランク値の上昇をきたすという問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、標的とする核酸を簡便に増幅させる方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはこれらの課題を解決すべく観察研究を進めた結果、プローブとして標的核酸の存在下でのみ環状となりうるスクレオチドを用いることにより、上記課題が解決されることを見出しました。本発明を完成させるに到った。即ち、本発明は検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくともこの直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、標的核酸配列(A)に直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を錠型とし、プライマースクレオチド(C)を利用し、錠型と相補的な配列の繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成することにより、核酸配列を増幅させることを特徴とする核酸配列の増幅方法である。また本発明の核酸を増幅するための試薬キットは、検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)、該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)、連結手段、核酸ポリメラーゼおよびスクレオチド三リン酸を含む核酸増幅用試薬キットである。

10 【0005】 本発明では、検出したい標的配列とハイブリッドを形成することにより、リガーゼを用いて環状化することが可能となるように設計された核酸分子を使用し、該環状化した核酸分子を錠型として、ポリメラーゼ反応により核酸配列を増幅させる。本発明における標的核酸(A)は、単鎖でも二重鎖でもよく、比較的純粋な状態であっても、核酸の混合物の一成分であってもよい。本発明に関する標的核酸の配列は長さ、構造等に特に制限されない。

20 【0006】 本発明におけるプローブヌクレオチド(B)とは、検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチドである(図1および図2のB参照)。プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端は図2に示されるように、標的核酸とアニールする部分を有する。該アニール部分は、それぞれ6~40スクレオチド、好ましくは各々10~30スクレオチドの長さが使用される。5'末端と3'末端に位置する上記アニール部分間を結ぶ配列の長さは、一般的に1~1000個、好ましくは10~100個のスクレオチドであればよい。また、この領域にRNAポリメラーゼのアンチプロモータ

一配列を含ませることも可能である。このRNAポリメラーゼのアンチプロモーター配列を持ったプローブヌクレオチドを用いた場合、プライマースクレオチドとしてRNAポリメラーゼのプロモーター配列を持つヌクレオチドを用いることにより、プロモーターに応じたRNAポリメラーゼ、およびリボヌクレオチド(ATP, CTP, GTP, UTP)を作用させれば、プローブヌクレオチドの相補鎖が繰り返し並んだRNAを合成することが可能である。

【0007】本発明のプライマースクレオチド(C)は、プローブヌクレオチド(B)と少なくとも部分的に相補的な配列を有していれば、構造、長さなどに制限されない。長さは一般的には、6~40ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドが使用される。また、プローブヌクレオチドがRNAポリメラーゼのアンチプロモーター配列を含む場合には、プライマースクレオチドにプロモーター配列を含ませたものを使用することが可能である。これらのオリゴヌクレオチド(B)および(C)は、例えばAB I社(Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザ391型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。他にもリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスファイト法等いかなる方法で合成してもよい。また、生物学的起源、例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物から単離してもよい。プローブヌクレオチド(B)の5'末端にはリン酸基を付加しておくことが好ましい。リン酸基の付加は、例えばATPの存在下で、T4ポリヌクレオチドキナーゼにより行うことができる。

【0008】本発明で使用される核酸ポリメラーゼは、ヘリカーゼ様活性を持つ核酸ポリメラーゼであれば、DNAポリメラーゼであっても、RNAポリメラーゼであってもよい。例えば $\phi$ 29DNAポリメラーゼを用いれば、環状核酸分子を錠型として、錠型と相補的な配列が繰り返し並んだ核酸を合成することが可能である(J.Biol.Chem. 264, 8935, 1989)。他にも、M2DNAポリメラーゼ、E.coli DNAポリメラーゼIII、T7RNAポリメラーゼ、T3RNAポリメラーゼ、SP6RNAポリメラーゼなどが利用できる。

【0009】本発明の核酸増幅方法は、標的核酸配列(A)に上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を錠型として、プライマースクレオチド(C)を利用し、錠型と相補的な配列の繰り返しした配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅させる。

【0010】本発明の核酸増幅法としては、次のような実施態様が挙げられる。(1)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分

的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：プライマースクレオチド(C)を操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0011】(2)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)とプライマースクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：検体試料中の標的核酸(A)を、操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0012】(3)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(d)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)、標的核酸配列(A)およびプライマースクレオチド

(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(c)：操作(b)で生成した環状ヌクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(d)：必要により、操作(c)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(c)を少なくとも1回繰り返す。

【0013】(4)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマースクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の隣接した直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(c)：プライマースクレオチド(C)を操作(b)で生成した環状プローブヌクレオチド(B')とアニールさせる。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を錠型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマースクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0014】本発明の上記実施態様(3)の理解のために、図2に本発明の原理を模式的に示す。以下、図を用いて本発明を説明する。尚、図中Aは標的核酸、Bは直鎖状プローブヌクレオチド、B'は環状化プローブヌクレオチド、Cはプライマースクレオチド、Dは核酸ポリメラーゼを示す。

操作(a)：直鎖状プローブヌクレオチド(B)中の検出配列と標的核酸(A)中の標的配列とのハイブリッドを形成させる。同時に又は別々にプライマースクレオチド(C)を該プローブヌクレオチド(B)にアニールさせる(図2(a)参照)。標的核酸が二重鎖の場合は加熱、アルカリ処理、酸処理などにより変性して一本鎖とする。加熱変性は例えば80～105℃で1～5分間処理することで実施できる。アルカリ処理は例えば、0.2～1規定のNaOH存在下で、1～30分間処理し、等量のHClで中和して用いることができる。酸処理は例えば0.

10

01～1規定のHCl存在下で、1～30分処理し、NaOHで中和して用いることができる。他の方法として酵素的に鎖分解を行なうこともできる。アニールは、好ましくはプローブヌクレオチド(B)およびプライマースクレオチド(C)について、それぞれ、最大のアニール選択性をもたらすように、選択された温度において行う。一般的には標的核酸(A)とプローブヌクレオチド(B)、およびプローブヌクレオチド(B)とプライマースクレオチド(C)がそれぞれ特異的に結合し、且つミスマッチによる非特異的結合が最小となるように、昇温させて行われる。

20

【0015】操作(b)：上記プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状化プローブヌクレオチド(B')とする(図2(b)参照)。該プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端がハイブリッド形成の結果、隣接する場合、T4DNAリガーゼ、T7DNAリガーゼ、大腸菌(*E. coli*)DNAリガーゼ、*Thermus thermophilus* DNAリガーゼ等の連結酵素を使用する方法が好ましい。また互いに隣接していない場合、DNAポリメラーゼおよび/または逆転写酵素によりギャップを埋めた後、連結酵素により連結することができる。この場合、ギャップ部分がA-Tペアのみ、またはC-Gペアのみで構成されるようにプローブヌクレオチド(B)を設計しておけば、添加するモノヌクレオチドをそれぞれA、TまたはC、Gのみとすることでミスマッチによりアニールしたオリゴヌクレオチドが間違って伸長されることを防止する方法もとることができる。連結酵素を使用する連結方法については、特開昭63-22197号公報およびW090/01069に開示の方法等、公知の手法により行うことができる。本発明において、標的核酸とアニールするオリゴヌクレオチド部分は6～40ヌクレオチド、好ましくは10～30ヌクレオチドの長さのものが使用される。

30

【0016】操作(c)：操作(b)で環状化したプローブヌクレオチド(B')を錠型に、また該プローブヌクレオチド(B')にアニールしたプライマースクレオチド(C)を利用して、核酸ポリメラーゼ(D)を用いて核酸合成反応を行う(図2(c)参照)。該操作は、例えばdNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)の4種のデオキシリボヌクレオチド)およびDNAポリメラーゼ(例えば $\phi$ 29DNAポリメラーゼ、M2DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼ、*Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼ等の核酸合成能力の高い酵素)を用いて、上記環状ヌクレオチドを錠型にして伸長反応を行わせることによって行われる。この方法は、例えばジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology; 56, 341-361, 1971)に記載されている技術及び条件を用いることができる。これらの酵素は、DNA Aの二重鎖の部分を剥しながらプライマースクレオチドを伸長する。

40

をすすめていくことができるので、当該操作に先だって、必ずしも標的核酸（A）と環状化プローブスクレオチド（B'）を分離する必要はない。プライマー伸長物は、標的配列と相同な配列を有するので、該伸長物は操作（a）における標的核酸（A）と同様にプローブスクレオチド（B）の標的核酸として利用されうる。この一連の操作を繰り返すことにより核酸の特定の配列を簡単に大量に得ることができる。また、プローブスクレオチド（B）、プライマースクレオチド（C）にそれぞれアンチプロモーター配列、プロモーター配列が含まれている場合には、核酸ポリメラーゼとして、プロモーターに応じたRNAポリメラーゼを用いることができる。当該操作は、NTP（ATP、CTP、GTP、UTPの4種のリボヌクレオチド）およびRNAポリメラーゼ（例えば、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼなど）を用いて該環状スクレオチドを錠型にしてRNA合成反応を行わせることにより行われる。RNAポリメラーゼ反応の結果として、プローブスクレオチド（B）の相補鎖が繰り返し並んだRNAが合成されるが、このRNAを錠型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、このcDNAにプライマースクレオチド（C）をアニールさせることにより、繰り返しRNAポリメラーゼを作用させて大量にRNAを合成することも可能である。操作（d）：必要により、操作（c）で生成した増幅核酸配列を用いて、操作（a）～（c）を少なくとも一回繰り返す。

## 【0017】

【発明の効果】本発明の増幅法によれば、プローブスクレオチド（B）の2つの末端が標的核酸（A）にアニールして連結された場合にのみ増幅反応が行われる。したがってオリゴスクレオチドの塩基配列による特異性と、2つの末端が連結される条件を満たす特異性の2つの特異性が要求され、それだけ非特異反応が抑制される。したがって核酸の特定の配列のみを増幅することが可能である。また、ヘリカーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを用いることにより、環状化したプローブスクレオチド1分子から複数の核酸配列が生成されるので、効率よく増幅することが可能である。生成した核酸配列を利用して反応をサイクル化することにより、より大量に増幅することもまた可能である。さらに、本発明の増幅法はプローブを増幅する方法ではないので、ミスマッチや非特異的ハイブリダイゼーションにより残存したプローブの増幅がなく、S/N (Signal/Noise) 比を増加させることができる。

## 【0018】

【実施例】以下に、本発明の実施例及び比較例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとするが、本発明はこれらの実施例によって限定されない。

(実施例1) 各種オリゴスクレオチドの合成

ABI 社DNA シンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて下記配列のオリゴスクレオチドを合成した。  
 ①プローブスクレオチド（第一オリゴスクレオチド①）：本オリゴスクレオチドは腸炎ビプリオTDH (Thermo stable Direct Haemolysin) 遺伝子の87番目から104番目、および105番目から126番目のスクレオチド配列、T7プロモーター配列と相補的な配列を有する（配列表1）。また、5'末端にリン酸基が結合している。  
 ②プライマースクレオチド（第二オリゴスクレオチド②）：本オリゴスクレオチドはT7プロモーターの配列を有する（配列表2）。手法はABI 社マニュアルに従い、0.2 μMスケールで実施した。各種オリゴスクレオチドの脱保護はアンモニア水で55°Cで一夜実施した。精製はファルマシア社製FPLCで逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴスクレオチドは必要により以下の方法で5'末端にリン酸基を結合させた。

オリゴスクレオチド	5 ~ 20 pmoles
10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 μl
1 mM ATP	1 μl
2) T4ポリヌクレオチドキナーゼ	10 単位
水を加えて全量を100 μlとして、37°Cで1時間反応させる。ここで、10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液とは、	
0.5M Tris-HCl (pH8.0)	
0.1M MgCl <sub>2</sub>	
0.1M 2-メルカプトエタノール	

を示す。

【0019】(実施例2) 標的核酸を増幅するためのキット

30 (A) 実施例1 の第一オリゴスクレオチド①  
 (イ) 実施例1 の第二オリゴスクレオチド②  
 (ウ) T4 DNAリガーゼ（東洋紡製）、T7 RNAポリメラーゼ（東洋紡製）、ATP、CTP、GTP、UTP

【0020】(実施例3) 実施例2 のキットを用いた標的核酸の増幅方法(1)

操作(a) 実施例1 の第一オリゴスクレオチド①0.1 molと、TDH 産業腸炎ビプリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1 μg をと共に10 μl のリガーゼ用反応液に加えた。94°Cに2分間保った後、50°Cに5分間保

40 温し、アニールさせた。リガーゼ用反応液

66 mM Tris-HCl (pH7.6)

6.6 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM ジチオスレイトール

66 μM ATP

操作(b) 上記反応液10 μl に、第二オリゴスクレオチド②0.1nmol を加え、操作(a) と同様の操作により、環状化した第一オリゴスクレオチド①にアニールさせた。

操作(c) 次に、T4 DNAリガーゼ 1単位（東洋紡製）を加え、37°Cで1時間反応させ、第一オリゴスクレオチドの

50 5'末端と3'末端を連結させた。

11

操作(d) 上記反応液に水40μl、T7 RNAポリメラーゼ反応液50μl、およびT7 RNAポリメラーゼ10単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを錠型として、37℃で30分間保温することにより増幅反応を実施した。

## T7 RNAポリメラーゼ反応液

80 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
10 mM ジチオスレイトール  
4 mM スペルミジン  
8 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM NaCl  
160 μg/ml BSA  
0.02 % トリトン X-100  
2 mM ATP, CTP, GTP, UTP

操作(e) その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色法により合成されたRNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スマア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を錠型として錠型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

## 【0021】(実施例4) 実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(2)

操作(a) 実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1nmolと第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolとを10μlのリガーゼ用反応液に加えた。94℃に2分間保った後50℃に5分間保温し、アニールさせた。

操作(b) 上記反応液に、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1μgを加え第一オリゴヌクレオチド①とアニールさせ、T4 DNAリガーゼ1単位(東洋紡製)を加え、37℃で1時間反応させることにより、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c) 上記反応液10μlに水40μl、T7 RNAポリメラーゼ反応液50μl、およびT7 RNAポリメラーゼ10単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを錠型として、37℃で30分間保温することにより増幅反応を実施した。

操作(d) その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色法により合成されたRNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スマア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を錠型として錠型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

## 【0022】(実施例5) 実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(3)

操作(a) 実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1molと第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolとを、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1μgと共に10μlのリガーゼ用反応液に加えた。94℃に2分間保った後、50℃に5分間保温し、アニールさせた。

12

せた。

操作(b) 次に、T4 DNAリガーゼ1単位(東洋紡製)を加え、37℃で1時間反応させ、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c) 上記反応液10μlに水40μl、下記反応液50μl、およびT7 RNAポリメラーゼ10単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを錠型として、増幅反応を実施した。

操作(d) その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色法により合成されたRNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スマア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を錠型として錠型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

## 【0023】(実施例6) 実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(4)

操作(a) 実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1molと、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1μgと共に10μlのリガーゼ用反応液に加えた。94℃に2分間保った後50℃に5分間保温し、アニールさせた。

操作(b)

次に、T4 DNAリガーゼ1単位(東洋紡製)を加え37℃で1時間反応させ、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c)

上記反応液10μlに、第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolを加え、操作(a)と同様の操作により、環状化した第一オリゴヌクレオチド①にアニールさせた。次に反応液に水40μl、下記反応液50μl、およびT7 RNAポリメラーゼ10単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを錠型として、37℃で30分間保温することにより増幅反応を実施した。

操作(d)

その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色法により合成されたDNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スマア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を錠型として錠型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

## 【配列表】

## 【0024】配列番号：1

配列の長さ：113

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：promoter

50 存在位置：22..38

13

14

特徴を決定した方法：S

他の特徴：T7プロモーター配列と相補的な配列

存在位置：1..18

他の特徴：腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem

olysin) 遺伝子の105番目から 126番目の配列と相補的

な配列

\* 存在位置：92..113

他の特徴：腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の87番目から 104番目の配列と相補的な  
配列

配列

GATGAGATAT TGTTTGTGT TCAAATCTCC CTATAGTGAG TCGTATTAAA ACTATTCTAT 60  
AGTGTCACTT AAATGATCCA CTAGTTCTAG AGCGGTTCCTC TGCCCCCGGT TCT 113

## 【配列表】

【0025】配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸 合成DNA

TAATACCACT CACTATA

## 【図面の簡単な説明】

【図1】第一オリゴヌクレオチド（プローブヌクレオチド）の構造を示した図である。

【図2】本発明の原理を模式的に示した図である。

【図3】実施例3、4、5および6において合成された 20 RNAの電気泳動パターンを示す。

## 【符号の説明】

図2中、Aは標的核酸、Bは第一オリゴヌクレオチド

## ※配列の特徴

10 特徴を表す記号：promoter

存在位置：1..17

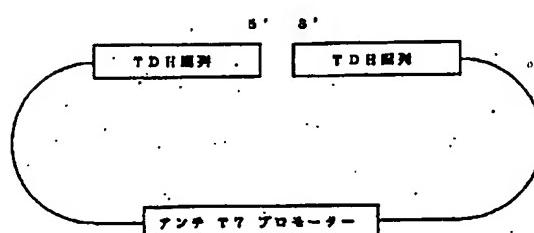
特徴を決定した方法：S

他の特徴：T7プロモーターの配列を有する  
配列

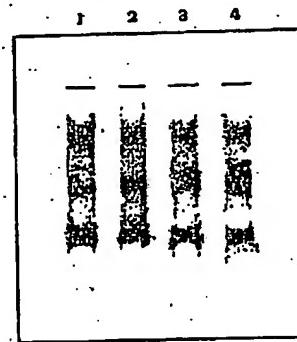
17

(プローブヌクレオチド)、B'は環状化した第一オリ  
ゴヌクレオチド、Cは第二オリゴヌクレオチド (プライ  
マーヌクレオチド) およびDは核酸ポリメラーゼを示  
す。図3中、レーン1、2、3および4はそれぞれ実施  
例3、4、5および6の試料に対応している。矢印は、  
鏡型として用いた第一オリゴヌクレオチドの位置を示  
す。

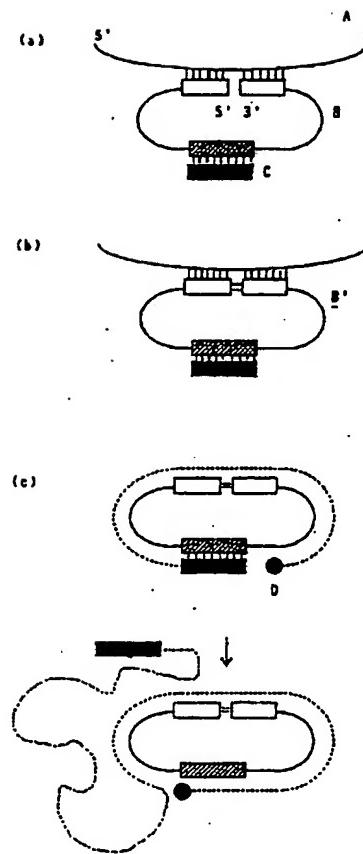
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 61 B 10/00識別記号 庁内整理番号 F I  
H 7831-4C

技術表示箇所

## Japan Patent Office

## Official Gazette for Unexamined Patents

Kokai Patent No. Hei 4(1992)-262,799

Publication Date: September 18, 1992

<u>International Cl<sup>5</sup></u>	<u>Identification Symbols:</u>	<u>Intraoffice No.:</u>
C 12 Q 1/68	Z	8114-B
C 12 N 15/10		
C 12 Q 1/68	A	8114-4B
//A 61 B 10/00	T	7831-4C
C 12 N 15/00	A	8828-4B
A 61 B 10/00	H	7831-4C*

Request for Examination: Not Requested

Number of Claims: 5

(Total of 9 Pages)

**A METHOD OF DETECTING A NUCLEIC ACID SEQUENCE AND  
A REAGENT KIT FOR THIS DETECTION METHOD**

Application No. Hei 3(1991)-46,193

Application Date: February 18, 1991

Inventors: Toshisuke Aono  
Toyobo Co., Ltd., Central Research Laboratories, 1-1, Katada 2  
chome, Otsu-shi, Shiga-ken

Hiroshi Takada  
Toyobo Co., Ltd., Central Research Laboratories, 1-1, Katada 2  
chome, Otsu-shi, Shiga-ken

Applicant: 000003160  
Toyobo Co., Ltd.  
2-8, Doshimahama 2 chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka-fu

---

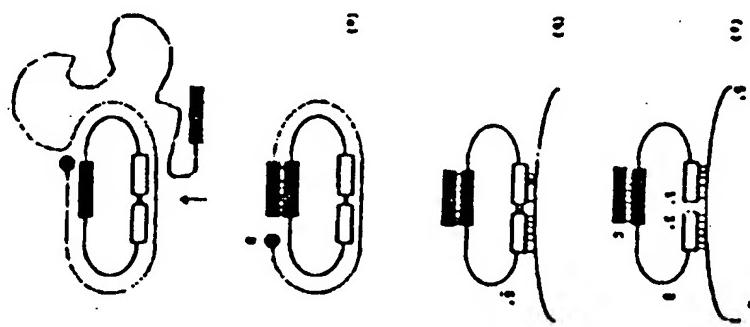
\* Application amendment given on the last page of the patent has been incorporated--Trans.  
note.

[Abstract]

[Objective] The objective of this invention is to easily amplify the nucleic acid that is targeted.

[Structure] By means of this invention, a straight-chain nucleotide probe (B) has a sequence that has been designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present. This nucleotide probe is hybridized with the target nucleic acid sequence (A) in a sample. As a result, said nucleotide (B) becomes cyclic and cyclic nucleotide probe (B') is obtained. This nucleotide probe serves as the template. The nucleic acid sequence is amplified by producing a single-strand nucleic acid with a repeating sequence that is complementary to the template using a nucleotide primer (C) with a sequence partly complementary to aforementioned nucleotide (B).

[Result] It is possible to inhibit non-specific reactions and amplify only a specific sequence. Moreover, several nucleic acid sequences are produced from 1 molecule of cyclic nucleotide probe by using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and therefore, it is possible to amplify a nucleic acid sequence very efficiently.



[Scope of Patent Claim]

[Claim 1] A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that a straight-chain nucleotide probe (B) has a sequence that has been designed to become cyclic if the target nucleic acid (A) is present in a sample and using this straight-chain nucleotide probe (B) and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to the straight-chain nucleotide probe (B), the straight-chain nucleotide probe (B) is hybridized with target nucleic acid sequence (A) in order to render the straight-chain nucleotide probe (B) cyclic. Then, with this cyclic nucleotide probe (B') serving as the template, the nucleic acid sequence is amplified by producing a single-strand nucleic acid that has a repeating sequence complementary to the template using a nucleotide primer (C).

[Claim 2] A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) that has a sequence at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the target nucleic acid sequence (A) is formed.

Procedure (b): The nucleotide primer (C) is annealed with the nucleotide probe (B) in the hybrid produced by procedure (a).

Procedure (c): Cyclic nucleotide B' is obtained by ligation of the 5' end and the 3'end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the annealed product produced by procedure (b).

Procedure (d): The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide (B') produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (d).

[Claim 3] A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the nucleotide primer (C) is formed.

Procedure (b): The target nucleic acid sequence (A) in a sample is annealed with the nucleotide probe (B) in the hybrid that was produced by procedure (a).

Procedure (c) Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the annealed product of procedure (b).

Procedure (d): The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (d).

[Claim 4] A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that procedures (a) through (d) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to the straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B), the target nucleic acid sequence (A) and the nucleotide primer (C) is formed.

Procedure (b): Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the hybrid produced by procedure (a).

Procedure (c): The nucleic acid sequence is amplified using a nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide (B') that was produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (d): When necessary, procedures (a) through (c) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (c).

[Claim 5] A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe.

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the target nucleic acid sequence (A) is formed.

Procedure (b): Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of adjacent straight-chain nucleotide probe (B) in the hybrid that was produced by procedure (a).

Procedure (c): The nucleotide primer (C) and the cyclic nucleotide probe (B') that was produced by procedure (b) are annealed.

Procedure (d) : The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the

cyclic nucleotide (B') that was produced by procedure (b) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence produced by procedure (d).

**[Claim 6]**

A reagent kit for amplification of a nucleic acid sequence, which includes a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample, a nucleotide primer (C) with a sequence that is partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B), a ligation means, nucleic acid polymerase, and nucleotide triphosphate.

**[Detailed Explanation of Invention]**

**[0001]**

**[Industrial field of application]**

This invention pertains to a method for amplifying a nucleic acid sequence and a reagent kit for this amplification method. This invention particularly pertains to a method of producing a nucleic acid with a known base sequence in larger quantities than it initially was present. Genetic disorders, cancer, infections, etc., can be easily diagnosed by this invention.

**[0002]**

[Prior art]

Detection of nucleic acids by hybridization has recently become popular as an effective method of diagnosing genetic disorders, cancer, infections, etc. There are cases where the base sequence that is the target of nucleic acid detection is only a small part of the nucleic acid in question. Detection by detection methods that use non-radioactive labeled probes and oligonucleotide probes labeled with radioactive isotopes is difficult because of problems with sensitivity, etc. Therefore, many efforts have been made to improve the sensitivity of probe detection systems (WO 87/03622, etc.). Moreover, the method whereby the desired nucleic acid is amplified by DNA polymerase is disclosed as a means for improving the sensitivity (Japanese Kokai Patent No. Sho 61(1986)-274,697; referred to below as "PCR"). However, there is a disadvantage with this method in that a complex temperature adjustment is necessary and special equipment is necessary. A method of amplification that uses DNA ligase has also been disclosed (WO 89/12,696, Japanese Kokai Patent No. Hei 2(1990)-2934, etc.) However, by means of this method, non-specific amplification by blunt end ligation with DNA ligase occurs. Three or more groups of probes are used in WO 89/12,696 in order to prevent this non-specific amplification, but there is a problem in that the cost increases with an increase in the number of probes. Moreover, it is known that RNA is produced from DNA using RNA polymerase and a method has been disclosed whereby nucleic acid is amplified using RNA polymerase (WO 89/01,050). Nevertheless,

by means of this method, sufficient amplification only by transcription and amplification with RNA polymerase is impossible. Consequently, the procedure whereby the RNA that has been produced is subjected to reverse transcriptase to produce DNA is performed. On the other hand, there is also a method whereby a probe is hybridized with the desired nucleic acid and then only the desired hybridized probe is amplified (BIO/TECHNOLOGY Vol. 6, 1197, 1988). However, by means of this method there is a problem in that probes that have been joined by non-specific reaction are also amplified and this leads to an increase in the blank value.

[0003]

[Problems to be solved by invention]

The objective of this invention is to present a method of easily amplifying the targeted nucleic acid sequences.

[0004]

[Means for solving problems]

The inventors proceeded with intensive studies in order to solve these problems and completed this invention upon discovering that the aforementioned problems can be solved by using as the probe a nucleotide that becomes cyclic only in the presence of the target nucleic acid. That is, this invention is a method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and

a nucleotide primer (C) with a sequence at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B), the straight-chain nucleotide probe (B) is hybridized with the target nucleic acid sequence (A) in order to render nucleotide probe (B) cyclic and then, using the cyclic nucleotide probe (B') that was produced as the template, the nucleic acid sequence is amplified by producing single-stranded nucleic acid with a repeating sequence complementary to the template produced using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C). Moreover, the reagent kit for amplifying a nucleic acid of this invention is a reagent kit for amplifying a target nucleic acid sequence, which includes a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample, a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B), a ligation means, nucleic acid polymerase, and nucleotide triphosphate.

[0005]

This invention uses nucleic acid molecules that have been designed to become cyclic in the presence of a ligase when they form a hybrid with the target nucleic acid sequence to be detected. The cyclic nucleic acid molecules serve as the template for amplification of the nucleic acid sequence by a polymerase reaction. The target nucleic acid sequence (A) in this invention can be single-helix or double-helix, and it can be relatively pure or it can be one component of

a mixture of nucleic acids. There are no special restrictions with respect to the length, structure, etc., of the sequence of the target nucleic acid of this invention.

[0006]

Nucleotide probe (B) in this invention is a straight-chain nucleotide probe with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in the sample (refer to B in Figures 1 and 2). The 5' end and the 3' end of the nucleotide probe (B) have the parts that are annealed with the target nucleic acid sequence, as shown in Figure 2. The annealed parts are the length of 6 to 40 nucleotides, preferably 10 to 30 nucleotides, each. The length of the sequence joining the aforementioned annealed parts at ends 5' and 3' is usually 1 to 1,000, preferably 10 to 100, nucleotides. Moreover, this region can also contain an anti-promoter sequence of RNA polymerase. When a nucleotide probe with this RNA polymerase anti-promoter sequence is used, it is possible to synthesize RNA that has repeating complementary strands of the nucleotide probe by exposing the nucleotide probe to RNA polymerase corresponding to the promoter and ribonucleotides (ATP, CTP, GTP, UTP), using a nucleotide with the promoter sequence of RNA polymerase as the nucleotide primer.

[0007]

There are no restrictions with respect to the structure, length, etc., of the nucleotide primer (C) of this invention as long as it is at least partly complementary to nucleotide probe (B). The length is usually 6 to 40 nucleotides, preferably 10 to 30 nucleotides. Moreover, a nucleotide primer that

contains anti-promoter can be used if the nucleotide probe contains the anti-promoter sequence of the RNA polymerase. These oligonucleotides (B) and (C) can be synthesized by the phosphoramidite method using, for instance, DNA synthesizer 391 made by ABI (Applied Biosystems, Inc.). They can also be synthesized by the phosphotriester method, the H-phosphonate method, the thiophosphate method, etc. Moreover, they can be isolated from biological sources, such as the products of cleavage by restriction endonuclease, etc. It is preferred that a phosphate group be attached to the 5' end of the nucleotide probe (B). For instance, phosphate groups can be attached by T4 polynucleotide kinase in the presence of ATP.

[0008]

As long as the nucleic acid polymerase used in this invention is nucleic acid polymerase with helicase activity, it can be DNA polymerase or RNA polymerase. For instance, nucleic acids with repeating sequences complementary to cyclic nucleic acid molecules as the template can be synthesized when  $\Phi$ 29 DNA polymerase is employed (J. Biol. Chem., 264, 8935, 1989). M2DNA polymerase, *Escherichia coli* DNA polymerase, T7RNA polymerase, T3RNA polymerase, SP6RNA polymerase, etc., can be used.

[0009]

By means of the nucleic acid amplification method of this invention, aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) is hybridized with the target nucleic acid sequence (A) to render the straight-chain nucleotide probe (B)

cyclic. Nucleic acid is then amplified by the method whereby using this cyclic nucleotide probe (B') that was produced as the template, single-stranded nucleic acid with a repeating sequence complementary to the template is produced using the nucleotide primer (C).

[0010]

The following are ways the target nucleic acid detection method of this invention can be performed: (1) A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) that has a sequence at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the target nucleic acid sequence (A) is formed.

Procedure (b): The nucleotide primer (C) is annealed with the nucleotide probe (B) in the hybrid produced by procedure (a).

Procedure (c): Cyclic nucleotide B' is obtained by ligation of the 5' end and the 3'end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the annealed product produced by procedure (b).

Procedure (d): The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide (B') produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (d).

[0011]

(2) A method for amplifying a nucleic acid, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the nucleotide primer (C) is formed.

Procedure (b): The target nucleic acid sequence (A) in a sample is annealed with the nucleotide probe (B) in the hybrid that was produced by procedure (a).

Procedure (c) Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the annealed product of procedure (b).

Procedure (d): The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (d).

[0012]

(3) A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that procedures (a) through (d) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid sequence (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to the straight-chain nucleotide probe (B).

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B), the target nucleic acid sequence (A) and the nucleotide primer (C) is formed.

Procedure (b): Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of the straight-chain nucleotide probe (B) in the hybrid produced by procedure (a).

Procedure (c): The nucleic acid sequence is amplified using a nucleic acid polymerase with helicase-like activity and nucleotide primer (c), with cyclic nucleotide (B') that was produced by procedure (c) serving as the template.

Procedure (d): When necessary, procedures (a) through (c) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced by procedure (c).

[0013]

(4) A method for amplifying a nucleic acid sequence, which is characterized by the fact that the following procedures (a) through (e) are performed using a straight-chain nucleotide probe (B) with a sequence designed to become cyclic if the target nucleic acid (A) is present in a sample and a nucleotide primer (C) with a sequence that is at least partly complementary to said straight-chain nucleotide probe.

Procedure (a): A hybrid of aforementioned straight-chain nucleotide probe (B) and the target nucleic acid sequence (A) is formed.

Procedure (b): Cyclic nucleotide (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of adjacent straight-chain nucleotide probe (B) in the hybrid that was produced by procedure (a).

Procedure (c): The nucleotide primer (C) and the cyclic nucleotide probe (B') that was produced by procedure (b) are annealed.

Procedure (d) : The nucleic acid sequence is amplified using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and the nucleotide primer (C), with the cyclic nucleotide (B') that was produced by procedure (b) serving as the template.

Procedure (e): When necessary, procedures (a) through (d) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence produced by procedure (d).

[0014]

The theory behind this invention is schematically represented in Figure 2 in order to explain aforementioned procedure (3) of performing this invention. This invention will now be explained while referring to Figure 2. Furthermore, A in the figure is the target nucleic acid, B is the straight-chain nucleotide probe, B' is the cyclic nucleotide probe, C is the nucleotide primer, and D is the nucleic acid polymerase.

Procedure (a): A hybrid is formed between the detecting sequence in the straight-chain nucleotide probe (B) and the target sequence in the target nucleic acid (A). Said nucleotide probe (B) is annealed with the nucleotide primer (C) at the same time, or by a separate process (refer to Figure 2(a)). If the target nucleic acid (A) is a double helix, it is made into a single-stranded acid by denaturation by heating, alkali treatment, acid treatment, etc. Denaturation by heating can be performed by, for instance, heating for 1 to 5 minutes at 80 to 105°C. Alkali treatment can be performed by, for instance, treatment for 1 to 30 minutes in the presence of 0.2 to 1 N NaOH and neutralization with the equivalent of HCl. Acid treatment can be accomplished by, for instance, treatment for 1 to 30 minutes in the presence of 0.01 to 1 N HCl and then neutralization with NaOH. The helix can also be broken down enzymatically. Annealing is performed at a temperature that has been selected so that the maximum annealing selectivity is realized for the nucleotide probe (B) and for the nucleotide primer (C). In general, annealing is performed by heating so that the target nucleic acid (A) and the nucleotide probe (B) and the nucleotide probe

(B) and the nucleotide primer (C) will specifically bond together and so that non-specific bonding by mismatching can be kept to a minimum.

[0015]

Procedure (b): Cyclic nucleotide probe (B') is obtained by ligation of the 5' end and the 3' end of aforementioned nucleotide probe (B) (refer to Figure 2(b)). It is preferred that a ligase, such as T4 DNA ligase, T7 DNA ligase, *E. coli* DNA ligase, *Thermus theromophilus* DNA ligase, etc., be used if the 5' end and the 3' end of said nucleotide probe (B) are adjacent as a result of hybridization. Moreover, if they are not adjacent to one another, ligation can be accomplished with a ligase after the gap has been closed with DNA polymerase and/or reverse transcriptase. In this case, if the nucleotide probe has been designed so that the gap is constructed from only an A-T pair or only a C-G pair, the method can be used whereby separation and elongation of the annealed oligonucleotide due to mismatching are prevented by using only A-T or C-G, respectively, as the added mononucleotide. A conventional method, such as the method in Japanese Kokai Patent No. Sho 63(1988)-22,197 or WO 90/01069, can be used for ligation with a ligase. By means of this invention, the length of the oligonucleotide segment that is annealed with the target nucleic acid should be 6 to 40 nucleotides, preferably 10 to 30 nucleotides.

[0016]

Procedure (c): Nucleic acid is synthesized using nucleic acid polymerase (D), the cyclic nucleotide probe (B') that was made in procedure (b) as the

template, and the nucleotide primer (C) annealed to said nucleotide probe (B') (refer to Figure 2(c)). Said procedure is performed by elongation, with the aforementioned cyclic nucleotide serving as the template, using, for instance, dNTP (the 4 types of deoxyribonucleotides: dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) and DNA polymerase (for instance, an enzyme with high nucleic acid-synthesizing activity, such as *Φ29DNA* polymerase, *M2DNA* polymerase, *T4DNA* polymerase, *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Thermus thermophilus* DNA polymerase, etc.). This method can be performed using, for example, the technology and conditions recorded in the Journal of Molecular Biology: 56, 341-361 (1971)). These enzymes can promote the synthesis of primer elongation product while peeling off part of the double helix of DNA and therefore, it is not always necessary to separate the target nucleic acid (A) and the cyclic nucleotide probe (B') before performing said procedure. The primer elongation product has a sequence that is homologous with the target sequence and therefore, said elongation product can be used as the target nucleic acid (A) in procedure (a) and as the target nucleic acid of the nucleotide probe (B). Thus, a specific sequence of a nucleic acid can be simply produced in mass quantity by repeating this series of procedures. Moreover, when the nucleotide probe (B) and the nucleotide primer (C) each have an anti-promoter sequence and a promoter sequence, the RNA polymerase corresponding to the promoters can be used as the nucleic acid polymerase. Said procedure is performed by carrying out an RNA synthesis reaction, with said cyclic nucleotide serving as the

template, using NTP (the 4 ribonucleotides: ATP, CTP, GTP and UTP) and RNA polymerase (for instance, T7RNA polymerase, T3RNA polymerase, SP6RNA polymerase, etc.). RNA that is formed of repeating complementary strands of the nucleotide probe (B) is synthesized as a result of the RNA polymerase reaction. It is also possible to synthesize RNA in mass quantity by repeated exposure to RNA polymerase, whereby using the aforementioned RNA as the template, cDNA is synthesized using reverse transcriptase, and then the nucleotide primer (C) is annealed to said cDNA.

Procedure (d): When necessary, procedures (a) through (c) are repeated at least once using the amplified nucleic acid sequence that was produced in procedure (c).

[0017]

[Results of the invention]

By means of the detection method of this invention, amplification occurs only when ligation is performed by annealing the 2 ends of the nucleotide probe (B) to the target nucleic acid (A). Consequently, 2 types of specificity, specificity from the base sequence of the oligonucleotide and specificity that satisfies the conditions under which ligation of the 2 ends occurs, are necessary and nonspecific reactions are inhibited. Consequently, it is possible to amplify a specific sequence of a nucleic acid. Moreover, several nucleic acid sequences are produced from 1 molecule of the cyclic nucleotide probe by using nucleic acid polymerase with helicase-like activity and therefore, amplification can be

more efficiently performed. By repeating the reaction using the nucleic acid sequence that was produced, amplification in larger quantities is possible and the detection sensitivity is improved. Furthermore, the amplification method of this invention does not include a method of amplification of the probe and therefore, there is no amplification of probe that remains due to mismatching and nonspecific hybridization. As a result, the S/N (signal/noise) ratio can be increased.

[0018]

[Examples]

The results of this invention will now be clarified even further using examples of this invention and comparative examples. However, this invention is not limited to these examples.

(Example 1)

Synthesis of a variety of oligonucleotides

Oligonucleotides of the sequences listed below were synthesized by the phosphoramidite method using DNA synthesizer 391 made by ABI.

(1) Nucleotide probe (first oligonucleotide (1)): This oligonucleotide has the nucleotide sequence from 87 to 104 and from 105 to 126 of the *Vibrio cholerae* THD (thermostable direct hemolysin) gene and the sequence complementary to the T7 promoter sequence (Sequence Table 1). Moreover, phosphate groups are bonded to the 5' end.

(2) Nucleotide primer (second oligonucleotide (2)): This oligonucleotide has the sequence of the T7 promoter (Sequence Table 2).

The method was performed on the 0.2  $\mu$ M scale in accordance with the ABI manual. Protector groups were eliminated from each type of oligonucleotide by treatment overnight with aqueous ammonia at 55°C. Purification was performed using a reversed-phase HPLC column made by Pharmacia Labs, Inc. When necessary, phosphate groups were bound to the 5' ends of the oligonucleotides that were synthesized by the following method:

Oligonucleotide	5 to 20 pmoles
10XT4 polynucleotide kinase buffer solution	10 $\mu$ l
1 mM ATP	1 $\mu$ l
T4 polynucleotide kinase	10 units

Water was added to bring the total volume to 100  $\mu$ l and then the mixture was reacted for 1 hour at 37°C. The 10XT4 polynucleotide buffer solution used here is

0.5 M Tris-HCl (pH 8.0),  
0.1 M MgCl<sub>2</sub> and  
0.1 M 2-mercaptoethanol.

[0019]

(Example 2)

Kit for amplifying the target nucleic acid

(a) First oligonucleotide (1) of Example 1

- (b) Second oligonucleotide (2) of Example 1  
(c) T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd.), T7 RNA polymerase (Toyobo Co., Ltd.), ATP, CTP, GTP, UTP

[0020]

(Example 3)

Method for amplification of the target nucleic acid using the kit in Example 2 (1)

Procedure (a)

First, 0.1 nmol of first oligonucleotide (a) of Example 1 and 1 µg of genomic nucleic acid that had been separated from a culture of TDH-producing *Vibrio cholerae* and partially purified were added to 10 µl of ligase reaction solution. This was kept at 94°C for 2 minutes and then at 50°C for 2 minutes and annealed. The control was a reaction solution with which genomic nucleic acid had not been mixed.

Ligase reaction solution:

Tris-HCl (pH 7.6) 66 mM

MgCl<sub>2</sub> 6.6 mM

Dithiothreitol 10 mM

ATP 66 µM

Procedure (b)

Then 0.1 nmol of second oligonucleotide (2) was added to 10  $\mu$ l of the aforementioned reaction solution and annealed by the same procedure as procedure (a) to first oligonucleotide (1) that had become cyclic.

Procedure (c)

Next, 1 unit of T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd.) was added and reacted for 1 hour at 37°C for ligation of the 5' and the 3' ends of the first oligonucleotide.

Procedure (d)

Then 40  $\mu$ l of water, 50  $\mu$ l of T7 RNA polymerase reaction solution and 10 units of T7 RNA polymerase were added to the aforementioned reaction solution and amplification was performed by keeping the mixture at 37°C for 30 minutes, using the cyclic oligonucleotide on which ligation had been performed by procedure (c) as the template.

T7 RNA polymerase reaction solution

Tris-HCl (pH 8.0)	80 mM
Dithiothreitol	10 mM
Spermidine	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 mM
NaCl	50 mM
BSA	160 $\mu$ g/ml
Triton X-100	0.02%
ATP, CTP, GTP, UTP	2 mM

Procedure (e)

Then electrophoresis was performed with agarose gel and the RNA that had been synthesized was identified by the ethidium bromide staining method. As a result, RNA was synthesized on the smear on the high-molecular-weight side, from 113 mers. This indicates that RNA molecules longer than the template were synthesized by using the cyclic molecules made by ligation of the first oligonucleotide as the template.

[0021]

(Example 4 )

Method of amplifying the target nucleic acid using the kit of Example 2 (2)

Procedure (a)

First, 0.1 nmol of first oligonucleotide (1) and 0.1 nmol of second oligonucleotide (2) of Example 1 were added to 10 µl of the ligase reaction solution. Annealing was performed by keeping the mixture at 94°C for 2 minutes and then at 50°C for 5 minutes.

Procedure (b)

First, 1 µg of genomic nucleic acid that had been separated from a culture of TDH-producing *Vibrio cholerae* and partially purified was added to the aforementioned reaction solution and annealed with the first oligonucleotide. Then 1 unit of T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd.) was added and reacted for 1 hour at 37°C. As a result, ligation of ends 5' and 3' of the first oligonucleotide was accomplished.

Procedure (c)

First, 40 µl of water, 50 µl of T7 RNA polymerase reaction solution and 10 units of T7 RNA polymerase were added to 10 µl of the aforementioned reaction solution and amplification was performed by keeping this mixture at 37°C for 30 minutes, using the cyclic oligonucleotide on which ligation had been performed by procedure (b) as the template.

Procedure (d)

Next, electrophoresis with agarose gel was performed and the RNA that had been synthesized was identified by the ethidium bromide staining method. As a result, RNA was synthesized on the smear on the high-molecular-weight side, from 113 mers. This indicates that RNA molecules that are longer than the template are produced when cyclic molecules obtained by ligation of the first oligonucleotide are used as the template.

[0022]

(Example 5)

Method for amplifying the target nucleic acid using the kit of Example 2  
(3)

Procedure (a)

First, 0.1 nmol of first oligonucleotide (1) and 0.1 nmol of second oligonucleotide (2) of Example 1 were added to 10 µl of the ligase reaction solution with 1 µg of the genomic nucleic acid that had been separated from the culture of TDH-producing *Vibrio cholerae* and partially purified. Annealing was

performed by keeping the mixture at 94°C for 2 minutes and then at 50°C for 5 minutes.

Procedure (b)

Then 1 unit of T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd.) was added and reacted for 1 hour at 37°C. As a result, ligation of ends 5' and 3' of the first oligonucleotide was accomplished.

Procedure (c)

Then 40 µl of water, 50 µl of the reaction solution listed below and 10 units of T7 RNA polymerase were added to 10 µl of the aforementioned reaction solution and an amplification reaction was performed using the cyclic oligonucleotide on which ligation had been performed by procedure (b) as the template.

Procedure (d)

Next, electrophoresis with agarose gel was performed and the RNA that had been synthesized was identified by ethidium bromide staining. As a result, RNA was synthesized on the smear on the high-molecular-weight side, from 113 mers. This indicates that RNA molecules that are longer than the template were synthesized by using a cyclic molecule obtained by ligation of the first oligonucleotide as the template.

[0023]

(Example 6)

Method for amplifying the target nucleic acid using the kit in Example 2 (4)

#### Procedure (a)

First, 0.1 nmol of first oligonucleotide (1) of Reference 1 and 1 µg of genomic nucleic acid that had been separated from a culture of TDH-producing *Vibrio cholerae* and partially purified were added to 10 µl of the ligase reaction solution. Annealing was performed by keeping the mixture at 94°C for 2 minutes and then at 50°C for 5 minutes.

#### Procedure (b)

Then 1 unit of T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd.) was added and reacted for 1 hour at 37°C. As a result, ligation of ends 5' and 3' of the first oligonucleotide was accomplished.

#### Procedure (c)

Next, 0.1 nmol of second oligonucleotide (2) was added to 10 µl of the aforementioned reaction solution and annealed to cyclic first oligonucleotide (1) by the same procedure as procedure (a). Then 40 µl of water, 50 µl of the reaction solution listed below and 10 units of T7 RNA polymerase were added to the reaction solution and an amplification reaction was performed using the cyclic oligonucleotide on which ligation had been performed by procedure (b) as the template.

#### Procedure (d)

Next, electrophoresis with agarose gel was performed and the DNA [sic] that was synthesized was identified by the ethidium bromide staining method. As a result, RNA was synthesized on the smear on the high-molecular-weight

side, from 113 mers. This indicates that RNA molecules that were longer than the template were synthesized using cyclic molecules obtained by ligation of the first oligonucleotide as the template.

[Sequence Tables]

[0024]

Sequence no.: 1

Sequence length: 113

Sequence form: Nucleic acid

Number of strands: single-strand

Topology: straight-chain

Types of sequence: other nucleic acids, synthetic DNA

Sequence characteristics

Symbol representing characteristic: promoter

Position: 22..38

Method of determining characteristics: S

Other characteristics: Sequence complementary to T7 promoter  
sequence

Position: 1..18

Other characteristics: sequence complementary to the sequence from  
105 to 126 of *Vibrio cholerae* TDH (Thermostable Direct Hemolysin) gene

Position: 92..113

Other characteristics: sequence complementary to nucleotide sequence from 87 to 104 of *Vibrio cholerae* TDH (Thermostable Direct Hemolysin) gene

Sequence

GATGAGATA TCTTTCTTGT TCAAACTCTCC CTATAGTGAG TCGTATTAAA ACTATTCTAT	60
AGTGTCACTT AATGATCCA CTAGTTCTAG AGCCGGTTTCC TGCCCCCGGT TCT	113

[Sequence table]

[0025]

Sequence no.: 2

Sequence length: 17

Sequence form: nucleic acid

Topology: single-strand

Type of sequence: other nucleic acids, synthetic DNA

Characteristics of sequence

Symbol representing characteristics: promoter

Position: 1..17

Method of determining characteristics: S

Other characteristics: Has T7 promoter sequence

Sequence

TATACGACT CACTATA

[Brief Explanation of Figures]

[Figure 1] This figure shows the structure of the first oligonucleotide (nucleotide probe).

[Figure 2] This is a schematic representation of the theory behind this invention.

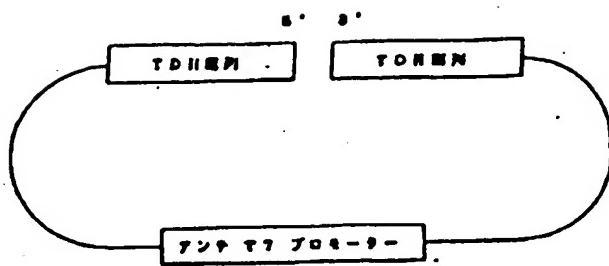
[Figure 3] This shows the electrophoresis patterns of the RNA synthesized in Examples 3, 4, 5 and 6.

[Definition of Symbols]

In Figure 2, A is the target nucleic acid, B is the first oligonucleotide (nucleotide probe), B' is the cyclic first oligonucleotide, C is the second oligonucleotide (nucleotide primer), and D is the nucleic acid polymerase. In Figure 3, A is the target nucleic acid, B is the first oligonucleotide (nucleotide probe), B' is the cyclic first oligonucleotide, C is the second oligonucleotide (nucleotide primer), and D is the nucleic acid polymerase. Lanes 1, 2 and 3 in Figure 3 correspond to the samples in Examples 3, 4, 5 and 6, respectively.

The arrow shows the position of the first oligonucleotide, which was used as the template.

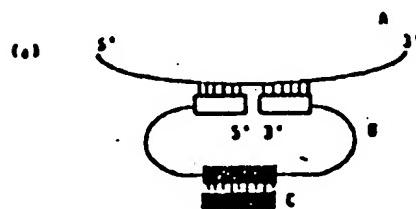
Figure 1



Key, top left to right: TDH sequence; TDH sequence

Bottom center: Anti-T7 promoter

[図2]



[図3]

